

# 鹅细小病毒 vp2 基因片段在原核系统中的表达及多克隆抗体的制备

侯秋莲<sup>1,2</sup>, 王 静<sup>1,2</sup>, 刘胜旺<sup>1</sup>, 孔宪刚<sup>1\*\*</sup>, 韩宗玺<sup>1</sup>, 冉多良<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

## Expression of the vp2 Gene Fragment of Goose Parvovirus in Prokaryotic System and Preparation of its Antiserum

HOU Qiu-lian<sup>1,2</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, LIU Sheng-wang<sup>1</sup>, KONG Xian-gang<sup>1\*\*</sup>, Han Zong-xi<sup>1</sup>, RAN Duo-liang<sup>2</sup>

(1. National Laboratory of Veterinary Biotechnology, Institute of Harbin Veterinary Medicine, CAAS, Harbin 150001, China; 2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** A 969bp fragment at the 5' end of the vp2 gene of *Goose parvovirus* isolate HG5/82 was subcloned into the *Nco*I site of prokaryotic expression vector pPROEX<sup>TM</sup> HTb. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH5 and induced with IPTG. SDS-PAGE analysis showed an induced product band about 36kDa, which was corresponding to the size of the fragment. The amount of the recombinant protein was evaluated by densitometric scanning. It indicated that the product was 21.4% of total bacterial protein. The induced bacteria was solubilized by 6mol/L Guanidine hydrochloric acid and purified by ProBond<sup>TM</sup> Resin. The antiserum against the recombinant protein was obtained by injecting the rabbit with fusion protein. We successfully expressed and purified the fusion protein from *E. coli* and obtained the antiserum against it, and laid a foundation for future studies on the bioactivity of GPV.

**Key words:** *Goose parvovirus*; vp2 gene; Cloning; Expression; Polyclonal antibody

**摘要:** 根据鹅细小病毒 (*Goose parvovirus*, GPV) 中国分离株 HG5/82 基因序列, 设计引物, 利用 PCR 技术扩增出 HG5/82 株 vp2 基因, 将其克隆到 pMD18-T 载体后, 转化入感受态细胞 TG1 中增殖。筛选阳性质粒, 将其与原核表达载体 pPROEX<sup>TM</sup> HTb 分别用 *Nco*I 酶切后回收目的片段, 进行定向连接, 产物转化入感受态 DH5, 重组质粒经酶切和测序证实目的基因正确克隆到表达载体的预期位点且插入方向正确, 构建了含有 HG5/82 主要结构基因 vp2 5' 端 969bp 片段的原核表达载体。经 IPTG 诱导后表达出与预期大小相符的约 36kDa 的融合蛋白, 表达形式为包涵体。薄层扫描结果表明表达产物约占菌体总蛋白的 21.4%。包涵体通过 6mol/L 盐酸胍裂解后, 利用镍离子亲和树脂进行纯化, 用纯化的分子量为 36kDa 的融合蛋白免疫新西兰白兔, 制备兔抗鹅细小病毒部分结构蛋白多克隆抗体。Western blot 分析表明该多克隆抗体与 HG5/82 毒株具有反应性, 说明该融合蛋白具有抗原性。

**关键词:** 鹅细小病毒; vp2 基因; 克隆; 表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)04-0383-05

鹅细小病毒 (*Goose parvovirus*, GPV) 属细小病毒科 (*Parvoviridae*) 细小病毒属 (*Parvovirus*) 的成员。主要引起 1 月龄雏鹅和雏番鸭的细小病毒病,

称小鹅瘟或 Derzsy's 病。该病是一种传播快、死亡率高的接触性传染病。对 10 日龄雏鹅发病率和死亡率可达 100%, 在易感群中的致死率高达 70%

收稿日期: 2005-01-04, 修回日期: 2005-03-08

作者简介: 侯秋莲 (1978-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学和分子免疫学研究。

\*\* 通讯作者: 孔宪刚 (1955-), 男, 研究员, 主要从事动物病毒分子生物学和分子免疫学研究。

Corresponding Author. Tel: 0451-82725786-200. E-mail: xgkong@hvri.ac.cn

[1,2]。该病以渗出性肠炎、小肠黏膜表层大片坏死脱落、肠道栓塞为特征性病变,是目前危害养鹅业的主要疾病之一。

GPV 为单链线状 DNA 病毒,大小约为 5.0kb,无囊膜,病毒粒子直径为 20~22nm,呈六面体外观。GPV 基因组包括左、右两个开放阅读框(ORF),之间间隔 18 个碱基。其中前者编码非结构蛋白 NS1 和 NS2,后者编码结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3。非结构蛋白和结构蛋白分别具有共同的羧基端,形成套式结构。三种结构蛋白终止于同一密码子。*vp* 基因编码病毒粒子的衣壳蛋白,是刺激机体产生抗体的成分,同时 VP 蛋白与病毒的毒力及致病性有关。其中 VP2 是主要免疫功能区,可刺激机体产生中和抗体。

鹅细小病毒病最早是由我国学者方定一于 1956 年在扬州发现,并于 1961 年用鹅胚分离到该病毒<sup>[3]</sup>。虽然本病发现较早,但目前有关 GPV 的致病机制及变异性等分子生物学方面的研究报道非常有限。本实验室从黑龙江省 1982 年某发病的养鹅场采集的病料中分离到鹅细小病毒 HG5/82 株<sup>[4]</sup>,并对该毒株的分子特征进行了初步研究<sup>[5]</sup>。在此基础上,本研究用原核表达系统高效表达了 HG5/82 的 *vp2* 基因 5'-端 969bp 大小的片段,并以纯化后的表达产物为抗原制备抗血清,采用 Western blot 分析表达产物的反应性,为进一步研究该毒株的基因功能、筛选具有抗原表位的 GPV 基因片段以及开发研制抗鹅细小病毒感染的基因工程疫苗和诊断试剂提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

12 日龄雏鹅购自哈尔滨近郊小鹅瘟非疫区。3 月龄新西兰白兔由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。GPV 中国分离株 HG5/82 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所分离鉴定并保存<sup>[4,5]</sup>。受体菌 *E. coli* TGI、DH5 由本室制备并保存;根据孔宪刚等<sup>[5]</sup>发表的 GPV 中国分离株 HG5/82 基因序列,设计引物,序列如下:上游引物(P2): 5'-ACCATGGGA TCCACGGCACCCGTC AAA-3',引入 *Nco*I 酶切位点(下划线部分);下游引物(LP): 5'-TTACA GATTTTGA GTCGACTCG AG-3',委托上海生工生物工程有限公司合成;相关工具酶和 pMD18-T 克隆载体均购自宝生物工程(大连)有限公司;原核表达载体 pPROEX<sup>TM</sup> HTb 购于 Gibco BRL 公司;ProBond<sup>TM</sup> 蛋白质纯化试剂

盒购自 Invitrogen 公司;弗氏完全和不完全佐剂购自 Sigma 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购于上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司;病毒 DNA 小量提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;羊抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司。其它化学试剂均为分析纯。

### 1.2 鹅抗 HG5/82 血清制备及鉴定

将 10 只 12 日龄雏鹅随机分为一个实验组和一个对照组,每组 5 只,分笼饲养于隔离器内。将第 5 代病毒尿囊液 HG5/82 经腿部肌肉注射接种 12 日龄实验组雏鹅,接种量为  $\log_{10}^{4.92}$  ELD<sub>50</sub>,对照组注射生理盐水 0.1mL/只。此后每间隔 3d 采血一次,分离血清,用 HG5/82 病毒与之作琼脂扩散试验<sup>[6,7]</sup>鉴定后,-20℃ 冻存储用。

### 1.3 重组表达载体的构建及鉴定

用 HG5/82 病毒尿囊液提取 DNA 作为 PCR 反应的模板,扩增 *vp2* 基因,经 DNA 凝胶回收试剂盒纯化,与 pMD18-T 载体按一定比例连接,转化入感受态细菌 TGI 中增殖。重组质粒经酶切及 PCR 初步鉴定正确后,选一个阳性质粒委托上海生物工程公司进行序列测定。经酶切位点分析后,将测序确证的阳性质粒与原核表达载体 pPROEX<sup>TM</sup> HTb 分别用 *Nco*I 酶切,凝胶回收目的片段和线性化载体,在 T4 DNA 连接酶作用下进行粘端连接,产物转化入感受态细菌 DH5,挑取单个转化菌落小量扩增,重组质粒经酶切初步鉴定后送交上海生物工程公司进行序列测定。

### 1.4 外源基因的表达及融合蛋白表达量的确定

将测序确证的阳性重组质粒转化 *E. coli* DH5 感受态细菌,经 Amp<sup>r</sup> (100μg/mL) 筛选,挑取单个菌落在含有 Amp 的 LB 培养基中振荡培养。当菌液 OD<sub>600</sub> 达 0.5 时,取 1mL 菌液作为诱导前对照,剩余菌液中加入终浓度为 0.6mmol/L 的 IPTG,37℃ 继续振荡培养,于不同时间段收集样品,离心收获细菌沉淀。将收集的细菌样品进行热裂解处理后进行 SDS-PAGE 电泳,经薄层扫描测定表达蛋白在菌体总蛋白中的含量。

### 1.5 融合蛋白的纯化

挑取单个阳性菌落于 100mL 含 Amp<sup>r</sup> 的 LB 培养基中进行培养,待 OD<sub>600</sub> nm 值增长至 0.5,加入终浓度为 0.6mmol/L 的 IPTG,37℃ 诱导培养。诱导 4h 后离心收集细菌,用 10mL 6mol/L 盐酸胍裂解缓冲液重新悬浮,按文献<sup>[8]</sup>方法用 ProBond<sup>TM</sup> 蛋白质纯化试剂盒纯化并取收集产物进行 SDS-PAGE 电泳。并将此融合蛋白命名为 F2。

## 1.6 融合蛋白多克隆抗体的制备

取纯化后的融合蛋白 1mL (约含 F2 蛋白 100 $\mu$ g),加入等体积弗氏完全佐剂乳化制备成油乳剂苗,对 3 月龄新西兰白兔四肢肌肉注射首次免疫。将纯化后的融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离后, KCl 染色液染色,准确切下含有目的蛋白的凝胶条带,加入 PBS 研磨后浸泡过夜,吸取上清 1mL (约含目的蛋白 50 $\mu$ g) 与等体积弗氏不完全佐剂混合,制成油乳剂苗。在第一次免疫后 20d 和 34d 分别进行第二、三次加强免疫。第三次免疫后 10d 采血,收集血清。

## 1.7 多克隆抗体的鉴定

将制备的兔抗 F2 蛋白多克隆抗体分别与纯化的 F2 蛋白和 HG5/82 鹅胚尿囊液进行 Western blot 检测。

## 2 结果

### 2.1 琼脂扩散法鉴定 HG5/82 病毒

将制备的鹅抗血清与 HG5/82 病毒尿囊液作琼扩试验,同时以注射生理盐水的对照组鹅血清为对照,可见接种病毒组鹅血清与病毒能发生反应,具有明显的沉淀线,(见图 1,箭头所指)。而对照组鹅血清则未见沉淀线。

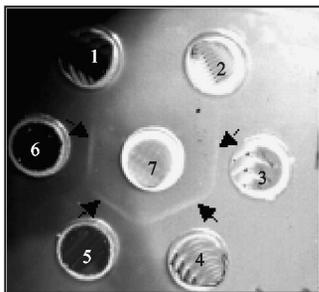


图 1 琼脂扩散法鉴定 HG5/82 病毒

Fig. 1 Reaction between HG5/82 isolate and antibody against this virus in the agar gel precipitin test

1-2, Negative serum of goose; 3-6, Serum of goose inoculated with HG5/82 isolate; 7, Allantoic fluid inoculated with HG5/82.

### 2.2 融合表达载体的构建及鉴定

将 HG5/82 的 vp2 基因 5'-端 969bp 基因片段亚克隆到原核表达载体 pPROEX™ HTb 的 Nco I 位点间,酶切鉴定阳性质粒并进行确证性序列测定,表明目的基因克隆到载体的预期位置,构建了融合表达载体。

### 2.3 外源基因的表达

将重组质粒转化 *E. coli* DH5 受体菌, IPTG 诱导后在不同时间收集菌样,经 SDS-PAGE 电泳发现目的基因获得了表达,分子量约为 36kDa,与预期

大小相符。而 IPTG 诱导前重组菌未出现此蛋白带,结果见图 2。

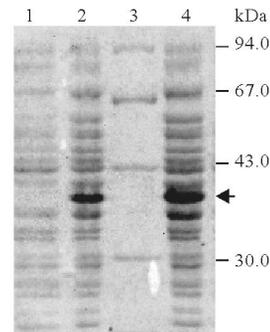


图 2 目的基因诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of induced expression of partial VP2 protein

1, Lysate of uninduced bacteria; 2, Lysate of bacteria induced for 2h with IPTG; 3, Protein molecular weight standard; 4, Lysate of bacteria induced for 4h with IPTG (Arrow indicates the expression product).

### 2.4 融合蛋白表达量的确定

将表达有目的蛋白的细菌蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,并将针对目的蛋白进行凝胶薄层扫描分析,结果分子量为 36kDa 的蛋白含量约占菌体总蛋白的 21.4%,结果见图 3。

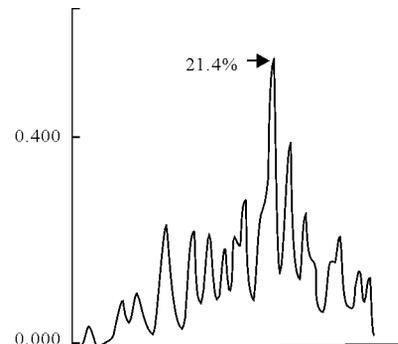


图 3 融合蛋白 SDS-PAGE 薄层扫描分析

Fig. 3 Thin layer scanning profiles of the expressed product separated on SDS-PAGE

Arrow indicates the expressed product.

### 2.5 融合蛋白的纯化

镍离子亲和树脂纯化回收带 6 $\times$ His 标签的融合蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后发现目的条带,大小约 36kDa,结果见图 4。

### 2.6 多克隆抗体和融合蛋白的 Western blot 分析

采用 Western blot 分析,结果发现该多克隆抗体能与纯化的融合蛋白 F2 发生反应;用 HG5/82 病毒尿囊液与兔抗鹅细小病毒 F2 蛋白多克隆抗体进行 Western blot 分析,结果发现该多克隆抗体与 HG5/82 毒株的分子量分别约为 77kDa、65kDa 和 60kDa 的三条蛋白带发生反应,证明本实验表达的

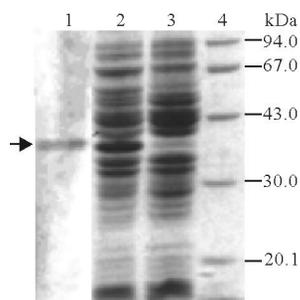


图 4 融合蛋白的纯化检测

Fig. 4 Analysis of purified recombinant protein

1, Recombinant protein purified by ProBond™ Resin (Arrow indicated); 2, Lysate of bacteria induced with IPTG; 3, Lysate of uninduced bacteria; 4, Protein molecular weight standard.

融合蛋白是具有生物学活性的蛋白,结果见图 5。

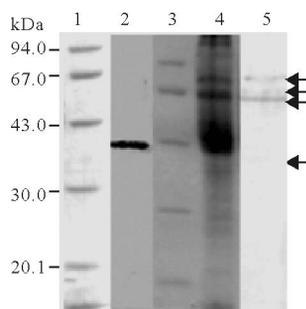


图 5 多克隆抗体和融合蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 5 Reactions of polyclonal antiserum with recombinant protein and HG5/82 isolate in Western blot

1, Protein molecular weight standard; 2, Western blot analysis of purified F2 protein; 3, Protein molecular weight standard; 4, SDS-PAGE analysis of allantoic fluid inoculated with HG5/82 strain; 5, Western blot analysis of HG5/82 strain and prepared polyclonal antiserum.

### 3 讨论

1989 年, Morinet 等<sup>[9]</sup>首次原核表达了人细小病毒 B19 的 *vp2* 基因,并证明有免疫原性。1996 年, Le Gall-Recule 等<sup>[10]</sup>利用杆状病毒真核表达系统表达了番鸭细小病毒 (*Muscovy duck parvovirus*, MDPV) 的 *vp2* 基因,表达产物可进行自我装配,形成 MDPV 样空衣壳,并且将其接种番鸭后可检测到 ELISA 抗体和中和抗体,说明其 VP2 蛋白具有免疫原性。应用相同的表达体系, Takehara 等<sup>[11]</sup>表达了鹅细小病毒 (GPV) 的 VP1 蛋白,并用于制备荧光抗体,检测鹅细小病毒感染。这些研究表明细小病毒的结构蛋白 (VP1, VP2 和 VP3) 可刺激机体产生中和抗体,通过体外表达细小病毒的该结构基因,制备重组抗原,可通过检测抗体用于病毒的检测和该病的诊断。由于 GPV 的培养和增殖常用鹅胚,因此常规全病毒抗原的研制等方面存在诸多不便。此外, GPV 分离株的抗原性均非常接近,

仅表现一个血清型,与本属其它病毒血清学无交叉反应<sup>[12]</sup>。因此,基因重组抗原在细小病毒群特异性诊断中具有潜在的应用前景。在我国, GPV 是危害养鹅业的主要传染病之一,但目前该病诊断和检测方法的研究报道很少<sup>[13-17]</sup>。因此,这方面的研究具有重要意义。

在前期研究中,我们对 GPV 中国分离株 HG5/82 的生物学和分子生物学特性进行了较为系统的研究<sup>[4,5]</sup>。在此基础上,我们试图应用原核表达系统表达其 *vp2* 基因,用于诊断抗原的研究,但 *vp2* 基因未获得表达。造成该结果的原因是由于 *vp2* 全长基因对于 pPROEX™ HTb 表达系统来说过于庞大而不易表达还是另有其因,有待我们深入研究。由于以往对各类细小病毒的研究发现, *vp2* 基因 5-端 969bp 片段内至少有一半的中和抗体产生位点<sup>[18]</sup>。因此,本研究在大肠杆菌中高效表达了 *vp2* 基因 5-端 969bp 的基因片段(表达产物命名为 F2),并证实其抗原性良好。此结果一方面为 GPV 重组诊断抗原研制提供思路。另一方面,也为 GPV B 细胞表位研究积累了材料。

本研究表达了 GPV HG5/82 毒株主要结构基因 *vp2* 部分片段,表达产物带有 6 × His 标签,其分子量小,生理条件下不带电荷,因而基本上不影响目的蛋白的结构和功能,而且能为融合蛋白的纯化提供方便。在不同时间对菌体进行诱导,发现融合蛋白随诱导时间的增加,其表达量增多,至 4h 达到最大值,此后表达量开始下降,说明诱导 4h 为最佳收获时间。由此可见,菌体过度培养后,氨苄青霉素逐渐失活、菌体老化、死亡、分解等因素均可导致表达量下降。采用 Western blot 分析,发现该多克隆抗体与病毒 HG5/82 的三种结构蛋白能发生反应,反应条带大小分别约为 77kDa、65kDa 和 60kDa。此结果与 Alexandrov 等<sup>[19]</sup>报道的用单克隆抗体 5A3 检测鹅细小病毒结构蛋白质的结果相一致,说明该多克隆抗体和单克隆抗体 5A3 可能中和的是 GPV 结构蛋白上相同的表位,但其表位的精确定位仍有待进一步研究。

Strassheime 等<sup>[20]</sup>研究犬细小病毒衣壳蛋白时发现两个决定中和抗体产生位点区,一个位于纤突顶端,另一个位于 VP2 第 300 氨基酸残基周围及三倍体纤突的“肩部”,它们的碱基突变可引起病毒抗原性的变化。犬细小病毒衣壳蛋白中有 10 个抗原表位,免疫吸附实验表明:其中 6 个位于病毒表面;6 个中有 3 个位于 VP2 氨基端,另外 3 个位于病毒三重对称轴上形成“穗状突起”的 VP2 的“环”上,是刺

激机体产生中和抗体的主要部位<sup>[18]</sup>。通过 X 射线技术,犬细小病毒(CPV)、猫细小病毒(FPV)、小鼠细小病毒(MVM)、人细小病毒 B19 的三维结构已被证实。其中 VP2 是构成病毒表面“穗状突起”的成分之一,VP2 的第 93、300、301、426 氨基酸残基与病毒和单抗的结合有关,在 VP2 氨基酸序列的第 95 位和第 200 位之间有 B 细胞识别位点。基于以上研究,结合本实验结果,我们推断 GPV 的 VP2 氨基端具有抗原表位和 B 细胞识别位点。

## 参考文献

- [1] Schettler C H. Isolation of a highly pathogenic virus from geese with hepatitis [J]. *Avian Dis*, 1971, 159(2): 323-325.
- [2] 辛朝安. 禽病学[M]. 第 2 版,北京:中国农业出版社,2003, 133-139.
- [3] 方定一. 小鹅瘟的介绍[J]. *中国兽医学杂志*, 1962, 8: 19-20.
- [4] 李桂霞,刘胜旺,孔宪刚,等. 鹅细小病毒 HG5/82 株的分离鉴定及生物学特性的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(3): 196-201.
- [5] 孔宪刚,李桂霞,刘胜旺,等. 鹅细小病毒分离株 HG5/82 的分子特征分析[J]. *中国病毒学*, 2005, 20(1): 28-32.
- [6] 霍峰,惠观涛. 应用琼脂扩散法检测小鹅瘟的病原抗体[J]. *中国兽医杂志*, 2000, 26(2): 21-22.
- [7] Gough R E. Application of the agar gel precipitin and virus neutralization test to the serological study of goose parvovirus [J]. *Avian Pathol*, 1984, 13: 501-509.
- [8] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第三版,黄培堂等译. 北京:科学出版社,2002, 1252-1259.
- [9] Morinet F, D'Auriol L, Tratschin J D. Expression of the human parvovirus B19 protein fused to protein A in *Escherichia coli*: recognition by IgM and IgG antibodies in human sera [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70(11): 3091-3097.
- [10] Le Gall-Recule G, Jestin V, Chagnaud P, et al. Expression of muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP2 and VP3) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins [J]. *J Gen Virol*, 1996, 77(9): 2159-2163.
- [11] Takehara K, Nakata T, Takizawa K, et al. Expression of goose parvovirus VP1 capsid protein by a baculovirus expression system and establishment of fluorescent antibody test to diagnose goose parvovirus infection [J]. *Arch Virol*, 1999, 144(8): 1639-1645.
- [12] Kisary J. Cross-neutralization tests on the parvoviruses isolated from goslings[J]. *Avian Pathol*, 1974, 3: 293-296.
- [13] 潘玉民,董玉平,石全瑞,等. 小鹅瘟免疫荧光诊断方法的研究[J]. *中国兽医科技*, 1990, 10: 6-10.
- [14] 邹叔和,李心坦,周建强,等. ABC-ELISA 检测小鹅瘟的研究[J]. *动物检疫*, 1992, 9(3): 6-7.
- [15] 秦爱建,王永坤,周阳生,等. 免疫酶琼脂扩散实验在小鹅瘟诊断中的应用[J]. *中国畜禽传染病*, 1993, 68(1): 30-31.
- [16] 段玉友,崔治中,王永坤. 鹅细小病毒核酸探针的制备及应用[J]. *中国畜禽传染病*, 1993, 72(5): 37-39.
- [17] 娄华,杨德威,贺东升,等. 番鸭细小病毒与鹅细小病毒的 PCR 鉴别诊断[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(6): 458-460.
- [18] Langeveld J P, Casal J I, Vela C, et al. B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface[J]. *J Virol*, 1993, 67: 765-772.
- [19] Alexandrov M, Alexandrova R, Alexandrov I, et al. Fluorescent and electron microscopy immunoassays employing polyclonal and monoclonal antibodies for detection of goose parvovirus infection[J]. *J Virol Methods*, 1999, 79: 21-32.
- [20] Strassheim M L, Gruenberg A, Veijalainen P, et al. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid[J]. *Virology*, 1994, 198(1): 175-184.